豆粕替代鱼粉对乌鳢肠道内产蛋白酶好氧菌组成及产蛋白酶能力的影响[a]

苗淑彦　朱锦裕　赵臣泽　董小敬　孙龙生

（扬州大学动物科学与技术学院，扬州 225009）

摘　要：本试验通过对乌鳢肠道内产蛋白酶好氧菌株进行分离和培养，并测定其产蛋白酶能力，来评价豆粕替代鱼粉对乌鳢肠道好氧菌组成及产蛋白酶能力的影响。首先配制以鱼粉为主要蛋白质源的对照组（D_1 组）饲料，饲料中鱼粉添加量为 55%；然后用豆粕替代对照组饲料中不同比例的鱼粉，配制 2 种试验饲料，使得饲粮中豆粕添加量分别为 35%（D_2 组）和 75%（D_3 组）。上述 3 种试验饲料分别投喂平均体重为（10.50±0.84） g 的乌鳢幼鱼 8 周，每种试验饲料投喂 3 个重复，每个重复 28 尾鱼，试验在室内养殖系统中进行。结果显示：随着豆粕替代鱼粉比例的增加，乌鳢的终末体重、增重率和特定生长率显著降低（P<0.05）。从 3 组乌鳢肠道内共分离出 21 株产蛋白酶好氧菌，其中，D_1 组为 16 株，D_2 组为 19 株，D_3 组为 20 株。以水解圈直径与菌株直径之比（R/r）表示产蛋白酶能力，豆粕替代鱼粉显著降低了菌株 P1004 和 P1018 的 R/r 值（P<0.05），但显著增加了菌株 P1009 和 P1012 的 R/r 值（P<0.05）。随着豆粕替代鱼粉比例的增加，菌株 P1018 的 R/r 值显著下降（P<0.05）。对产蛋白酶能力最大的菌株 P1009 进行生理生化特征鉴定和 16S rDNA 序列分析，得出菌株 P1009 为铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）。本试验结果表明，乌鳢肠道内存在着丰富的产蛋白酶好氧菌，豆粕替代鱼粉对乌鳢肠道内产蛋白酶好氧菌数量和产蛋白酶能力产生了一定影响，乌鳢肠道内产蛋白酶能力最强的菌株 P1009 是铜绿假单胞菌，可以考虑将其作为益生菌开发的潜在菌种。

关键词：乌鳢；蛋白质源；产蛋白酶好氧菌；产蛋白酶能力；益生菌

中图分类号：S963　　　　　　　文献标识码：A　　　　　　　　文章编号：

鱼类消化道黏膜表面附着着一个复杂的、动态的微生物群体，菌群数量基本固定在每克 10^7～10^8 个细菌的范围内[1]，这些细菌存在于宿主消化道中特定的位置，并参与宿主的饲料

收稿日期：2017-04-10

基金项目：国家自然科学基金（31402306）；江苏省博士后科研资助计划(1601058B)

作者简介：苗淑彦（1978-），女，江苏扬州人，副教授，主要从事水生动物营养与饲料研究。E-mail： shuyanmiao@126.com

消化、营养吸收、能量代谢等过程[2-3]。通过对人类后肠微生物元基因组进行大规模鸟枪法测序分析发现，微生物基因组中含有大量与糖类、氨基酸、外来化合物、甲烷、维生素和胆固醇等物质代谢相关的基因[4]。Bairagi 等[5]发现，草鱼（*Ctenopharyngodon idella*）肠道中富含能分泌淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶的微生物。对鱼类肠道中能分泌消化酶的微生物进行纯化培养是获得水产益生菌的主要来源，通过不同途径将益生菌株定植在鱼类肠道内，可以协同鱼类肠道分泌的消化酶共同降解饲料中的营养成分，提高鱼类的饲料利用效率和生长效率。例如，向饲料中添加益生菌能有效提高重口裂腹鱼（*Schizothorax davidi*）[6]和奥尼罗非鱼（*Oreochromis niloticus* ♀×*O. aureus* ♂）[7]的生长速度和肠道消化酶活性。

此外，消化道内的菌群结构对食物具有可塑性，易受饲料营养成分的影响[8-11]。钟蕾等[12]通过聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳（PCR-DGGE）指纹分析并结合克隆、测序，对鳡（*Elopichthys bambusa*）的肠道菌群结构及多样性进行了研究，结果发现用配合饲料和冰鲜鱼饲喂的鳡肠道内容物菌群结构存在显著差异。水产养殖业的快速发展使得对鱼粉的需求量急剧上升，但由于过度捕捞、环境污染及厄尔尼诺现象等不良气候的影响，野生鱼粉资源日益减少，世界鱼粉的供应已不能满足养殖需求。减少水产饲料中鱼粉的添加量，从而降低水产饲料对鱼粉资源的依赖，是缓解鱼粉资源压力的有效措施之一。在对鱼粉替代蛋白质源的研究中，由于豆粕具有蛋白质含量高、消化率高和氨基酸平衡等特点，被作为水产饲料中适宜的植物蛋白质源。本研究通过对乌鳢（*Channa argus*）肠道内产蛋白酶好氧菌株的培养，并测定其产蛋白酶的能力，来评价不同蛋白质源（全鱼粉和豆粕替代部分鱼粉）对乌鳢肠道好氧菌组成及产蛋白酶能力的影响，为进一步完善乌鳢肠道微生态营养理论提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验饲料配方和制作

对照组（D_1 组）饲料蛋白质源为鱼粉，添加量为 55%。在对照组饲料的基础上，用豆粕替代不同比例的鱼粉配制 2 种试验组饲料，饲粮中豆粕添加量分别为 35%（D_2 组）和 75%（D_3 组）。试验饲料组成及营养水平见表 1。配制饲料前，所有原料过 80 目筛，混匀，然后添加鱼油和大豆卵磷脂充分混合，加水混匀后在螺杆挤压机中制成 3.0 mm×4.0 mm 的颗粒，50 ℃烘箱内干燥后置-20 ℃冰箱保存。

表 1 试验饲料组成及营养水平（干物质基础）

Table 1 Composition and nutrient levels of experimental diets (DM basis) %

项目 Items	组别 Groups		
	D_1	D_2	D_3
原料 Ingredients			
鱼粉 Fish meal	55.00	35.00	15.00
豆粕 Soybean meal		35.00	75.00
面粉 Wheat flour	25.00	18.00	0.44
麸皮 Wheat bran	10.44	2.44	0.00
大豆卵磷脂 Soybean lecithin	2.00	2.00	2.00
鱼油 Fish oil	4.00	4.00	4.00
维生素预混料 Vitamin premix[1)]	0.50	0.50	0.50
矿物质预混料 Mineral premix[2)]	0.50	0.50	0.50
磷酸二氢钙 $Ca(H_2PO_4)_2$	1.50	1.50	1.50
氯化胆碱 Choline chlorine (95%)	1.00	1.00	1.00
乙氧基喹啉 Ethoxyquin	0.03	0.03	0.03
维生素 C Vitamin C	0.03	0.03	0.03
合计 Total	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels			
干物质 DM	92.78	92.83	93.41
粗蛋白质 Crude protein	42.27	43.39	42.25
粗脂肪 Crude lipid	8.87	8.50	8.13
粗灰分 Ash	13.54	12.81	12.39

[1)]维生素预混料为每千克饲料提供 Vitamin premix provided the following per kg of diets：VA 32 mg，VD 5 mg，VE 240 mg，VK 10 mg，VB_1 25 mg，VB_2 45 mg，烟酸 nicotinic acid 200 mg，VB_6 20 mg，生物素 biotin 60 mg，肌醇 inositol 800 mg，泛酸钙 calcium pantothenate 60 mg，叶酸 folic acid 20 mg，VB_{12} 10 mg，VC 2 000 mg，微晶纤维素 microcrystalline cellulose 4 292.54 mg。

[2)] 矿物质预混料为每千克饲料提供 Mineral premix provided the following per kg of diets：$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 10 mg，Na_2SeO_3 20 mg，$MnSO_4 \cdot H_2O$ 45 mg，$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (1%) 50 mg，$ZnSO_4 \cdot H_2O$ 50 mg，$Ca(IO_3)_2$ (1%) 60 mg，$FeSO_4 \cdot H_2O$ 80 mg，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 200 mg，沸石粉 zeolite powder 18 485 mg。

1.2 试验用鱼及养殖管理

试验用乌鳢幼鱼购自江苏省扬州市高邮董氏特种鱼类养殖场，为当年人工培育的同一批种苗，大小均匀、健康无病。养殖试验在扬州大学水产养殖温室内进行，养殖容器为300 L

的玻璃钢桶，桶内水流速度为2 L/min。试验前投喂商业饲料（粗蛋白质含量为45%），暂养2周以适应环境。试验开始前禁食24 h，然后选择体重相近[（10.50±0.84） g]、体格健壮的乌鳢幼鱼，随机分为3组，每组设3个重复，每个重复放养28尾鱼。每天人工投喂2次（08:00和17:00）试验饲料，每日观察摄食情况并记录，调整饲料投喂达饱食水平，试验周期为8周。在养殖期间，每周检测2次水质指标，水温为（27.5±1.5） ℃，pH为6.7～6.9，溶解氧浓度为5.5～6.5 mg/L，氨氮浓度为0.037～0.072 mg/L、亚硝酸氮浓度为0.014～0.031 mg/L。

1.3 样品收集及指标测定

养殖试验结束后，乌鳢试验鱼禁食 24 h 后取样。所有试验鱼在取样前要用 MS-222（100 mg/kg）麻醉，以减少取样操作对鱼体产生的应激。逐尾鱼称重，计算增重率（WGR）和特定生长率（SGR）；计数每桶的鱼尾数，计算成活率(SR)。

计算公式如下：

增重率（%）=100×（W_t－W_0）/W_0；

特定生长率（%/d）=100×（ln$\overline{W}_t$－ln$\overline{W}_0$）/t；

成活率（%）=100×N_t/N_0。

式中：W_0为试验初各组鱼体总重（g）；W_t为试验终各组鱼体总重（g）；$\overline{W}_0$为试验初各组鱼平均体重（g）；$\overline{W}_t$为试验终各组鱼平均体重（g）；t为试验天数（d）；N_0为试验初各组鱼尾数；N_t为试验终各组鱼尾数。

随后，每重复随机取 10 尾鱼，用 75%乙醇棉球擦拭鱼体表面以减少细菌污染，用无菌手术剪和手术刀进行解剖。取出肠道后，用灭菌棉线将肠道两端扎紧，置于离心管中，加入 2.5 mL 磷酸盐缓冲液（PBS）。为保证试验数据的可靠性，10 尾鱼的肠道置于同一个离心管中，并进行 3 次重复试验。

好氧菌的培养：使用无菌手提式匀浆机匀浆肠黏膜，并用灭菌 PBS 按 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} 的梯度对匀浆液进行稀释后混匀；取不同梯度的稀释液各 50 μL，分别涂布于淡水鱼类培养基（青岛高科园海博生物技术有限公司产品，配方如下：蛋白胨 5.0 g，牛肉膏 2.5 g，酵母膏 2.5 g，葡萄糖 1.0 g，氯化钠 15.0 g，硫酸镁 0.05 g，磷酸氢二钾 0.2 g，琼脂 15.0 g，pH 7.2～7.4）上，每个样品做 3 个平行。30 ℃恒温培养 48 h 后进行菌落计数，并用接种环依此挑取不同大小、不同颜色和不同形状的单个菌落在培养基上进行纯化培养。30 ℃恒温培养 24 h 后，选取纯化菌落，接种于液体培养基中，置于摇床（200 r/min）30 ℃扩大培养 18 h。各菌液分别取 1 mL 置于无菌离心管内，与 40%甘油按 1:1 比例混合后保存于-20 ℃

冰箱，待提取 DNA 用于菌株鉴定。

产蛋白酶好氧菌株的筛选及产蛋白酶能力的测定：将纯化的菌液稀释至 10^{-7}，混匀后取 50 μL 涂布于蛋白酶筛选培养基（配方如下：干酪素 10.0 g，Na_2HPO_2 2.0 g，$MgSO_4$ 0.5 g，NaCl 0.20 g，*L*-酪氨酸 0.05 g，牛肉浸膏 3.0 g，琼脂 20 g，蒸馏水 1 000 mL，pH 8.0，121 ℃灭菌 20 min）中，每个样品设 5 个平行，28 ℃培养 24 h 后观察菌落周围有无水解圈，测量产蛋白酶菌株的直径（r，cm）和对应的水解圈直径（R，cm），用水解圈直径与菌株直径之比（R/r）表示产蛋白酶能力的大小。

产蛋白酶好氧菌株的鉴定：参照《伯杰细菌鉴定手册》（第 8 版）对菌株进行细菌形态观察和生理生化鉴定。

16S rDNA 鉴定方法如下：采用天根公司细菌基因组提取试剂盒（TIANamp Bacteria DNA Kit）按试验操作提取目标菌株 DNA。以 DNA 为模板，采用通用引物扩增其 16S rDNA 片段，正向引物为 27F：5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3'；反向引物为 1492R：5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′。反应体系中含 ddH_2O 21 μL，Mix 25 μL，正向、反向引物各 1 μL，DNA 模板 2 μL。PCR 扩增条件为：94 ℃ 5 min，94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 90 s，循环 35 次；72 ℃ 7 min，4 ℃保存。PCR 扩增产物由华大基因公司测序。

1.4 数据统计分析

采用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件进行统计分析，数据采用平均值±标准误（mean±SE）的形式表示，显著水平为 $P<0.05$。当差异显著时采用 *t* 检验比较分析组内和组间的差异显著性。

2 结　果

2.1 豆粕替代鱼粉对乌鳢生长性能的影响

由表 2 可知，D1 组乌鳢的终末体重、增重率和特定生长率显著高于 D2 和 D3 组（$P<0.05$），D2 组乌鳢的终末体重、增重率和特定生长率又显著高于 D3 组（$P<0.05$）。D1、D2 和 D3 组乌鳢的成活率分别为 88.00%、86.67%和 88.00%，豆粕替代不同比例鱼粉对乌鳢的成活率没有产生显著影响（$P>0.05$）。

表 2　豆粕替代鱼粉对乌鳢生长性能的影响

Table 2　Effects of replacement of fish meal by soybean meal on growth performance of *Channa argus*

项目	初始体重	终末体重	增重率	特定生长率	成活率
Items	IBW/,g	FBW/g	WGR/%	SGR/(%/d)	SR/%

D_1组 D_1 group	8.68±0.09	44.54±0.61[a]	413.10±2.21[a]	2.60±0.01[a]	88.00±2.31
D_2组 D_2 group	8.62±0.12	32.83±0.35[b]	281.25±8.37[b]	2.12±0.04[b]	86.67±2.67
D_3组 D_3 group	8.66±0.21	25.25±0.43[c]	191.77±8.89[c]	1.70±0.05[c]	88.00±2.31

同列数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著(P>0.05)，不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。表 3 同。

In the same column, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference (P>0.05), while with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05). The same as Table 3.

2.2 豆粕替代鱼粉对乌鳢肠道产蛋白酶好氧菌数量的影响

通过对各组乌鳢肠道菌群进行培养，共分离出 21 株具有产蛋白酶能力的好氧菌。其中，D_1组为 16 株，D_2组为 19 株，D_3组为 20 株，菌株编号见表 3。其中，D_1组未检出的菌株为 P1003、P1006、P1015、P1016 和 P1020，D_2组未检出的菌株为 P1002 和 P1020，D_3组未检出的菌株为 P1002。

在菌株筛选的基础上，对每株好氧菌的产蛋白酶能力进行测定，测定结果用 R/r 表示，结果见表 3。统计分析表明，同组内不同菌株间的 R/r 值存在显著差异（P<0.05）。D_1组内产蛋白酶能力较强的菌株为 P1007、P1008 和 P1009，D_2和 D_3组内产蛋白酶能力较强的菌株为 P1009 和 P1012。其中，P1009 菌株在 3 组内的产蛋白酶能力均最强，3 组中该菌株的 R/r 值分别为 2.91、3.22 和 3.15；D_1组内产蛋白酶能力最弱的菌株包括 P1002、P1010、P1014 和 P1019，D_2组内产蛋白酶能力最弱的菌株包括 P1003、P1010 和 P1014，D_3组内产蛋白酶能力最弱的菌株包括 P1003、P1014 和 P1019。

表 3　分离自乌鳢肠道的产蛋白酶好氧菌株及其产蛋白酶能力

Table 3　Protease-producing aerobic bacteria strains isolated from *Channa argus* intestinal tract and their protease-producing activity (n=5)

菌株编号 No. of strains	R/r 值 The ratio of R/r		
	D_1组 D_1 group	D_2组 D_2 group	D_3组 D_3 group

P1001	1.76±0.04^{b}	1.65±0.06^{c}	1.69±0.05^{b}
P1002	1.45±0.05^{a}	—	—
P1003	—	1.32±0.03^{a}	1.33±0.04^{a}
P1004	1.85±0.06^{b}	1.67±0.04^{c}	1.62±0.05^{b}
P1005	1.76±0.05^{b}	1.89±0.06^{d}	1.84±0.06^{c}
P1006	—	2.32±0.06^{f}	2.57±0.10^{f}
P1007	2.68±0.12^{e}	2.50±0.06^{g}	2.46±0.10^{f}
P1008	2.72±0.08^{e}	2.65±0.04^{h}	2.65±0.09^{f}
P1009	2.91±0.08^{f}	3.22±0.17^{i}	3.15±0.07^{h}
P1010	1.49±0.08^{a}	1.37±0.07^{a}	1.57±0.11^{b}
P1011	1.95±0.06^{bc}	1.77±0.11^{cd}	1.73±0.09^{c}
P1012	2.44±0.20^{de}	2.92±0.16^{i}	2.94±0.14^{g}
P1013	2.16±0.13^{cd}	2.29±0.09^{f}	2.18±0.02^{e}
P1014	1.32±0.12^{a}	1.26+0.11^{a}	1.31±0.07^{a}
P1015	—	2.52±0.02^{g}	2.59±0.09^{f}
P1016	—	1.99±0.14^{d}	1.96±0.09^{cd}
P1017	2.01±0.05^{c}	1.86±0.10^{d}	1.90±0.06^{cd}
P1018	2.19±0.09^{d}	1.95±0.04^{d}	1.84±0.06^{c}
P1019	1.46±0.10^{a}	1.46±0.06^{b}	1.42±0.11^{ab}
P1020	—	—	1.62±0.07^{b}
P1021	2.22±0.5^{d}	1.97±0.13^{e}	2.03±0.08^{d}

2.3 豆粕替代鱼粉对乌鳢肠道产蛋白酶好氧菌产蛋白酶能力的影响

由表 4 可知，豆粕替代鱼粉显著降低了菌株 P1004 和 P1018 的产蛋白酶能力（$P<0.05$），但显著增加了菌株 P1009 和 P1012 的产蛋白酶能力（$P<0.05$）；另外，随着豆粕替代鱼粉比例的增加，菌株 P1018 产蛋白酶的能力显著下降（$P<0.05$）。

表 4 豆粕替代鱼粉对乌鳢肠道产蛋白酶好氧菌产酶能力的影响

Table 4 Effects of replacement of fish meal by soybean meal on protease-producing activity of protease-producing aerobic bacteria in intestinal tract of *Channa argus* (n=5)

菌株编号	R/r 值 The ratio of R/r

No. of strains	D_1组 D_1 group	D_2组 D_2 group	D_3组 D_3 group
P1002	1.45±0.05	—	—
P1003	—	1.32±0.03	1.33±0.04
P1004	$1.85±0.06^{b}$	$1.67±0.04^{a}$	$1.62±0.05^{a}$
P1006	—	2.32±0.06	2.57±0.10
P1009	$2.91±0.08^{a}$	$3.22±0.17^{b}$	$3.15±0.07^{b}$
P1012	$2.44±0.20^{a}$	$2.92±0.16^{b}$	$2.94±0.14^{b}$
P1015	—	2.52±0.02	2.59±0.09
P1016	—	1.99±0.14	1.96±0.09
P1018	$2.19±0.09^{c}$	$1.95±0.04^{b}$	$1.84±0.06^{a}$
P1020	—	—	1.62±0.07

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著(P>0.05)，不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference (P>0.05), while with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05).

2.4 产蛋白酶能力最强菌株 P1009 的鉴定

用淡水鱼类培养基进行培养时发现，菌株 P1009 的菌落较小，中央隆起，且为革兰氏染色阴性菌。其生理生化特征如表 5 所示，精氨酸双水解酶试验、氧化酶试验、葡萄糖发酵试验和枸橼酸盐是验结果均为阳性，而氧化酶试验和麦芽糖酶试验结果均为阴性。对菌株 P1009 进一步进行 16S rDNA 序列分析鉴定，结果表明菌株 P1009 为铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）。

表 5　菌株 P1009 生理生化特征鉴定结果

Table 5　Identification results of physiological and biochemical characteristics of strain P1009

试验 Test	结果 Results	试验 Test	结果 Results
精氨酸双水解酶试验 Arginine dihydrolase test	+	赖氨酸脱羧酶试验 Lysine decarboxylase test	-
氧化酶试验 Oxidase test	+	麦芽糖氧化试验 Maltose oxidation test	-
葡萄糖发酵试验 Glucose fermentation tset	+	枸橼酸盐试验 Citrate test	+

“+”表示阳性，“-”表示阴性

"+" means positive, and "-" means negative.

3 讨　论

鱼粉具有高蛋白质，富含必需氨基酸、脂肪酸和未知生长因子，适口性好以及较好的消化率等优点，一直以来被作为水产饲料中的主要蛋白质源。在本研究中，全鱼粉对照组（D_1组）乌鳢的增重率和特定生长率显著高于豆粕替代组（D_2组、D_3组），充分说明鱼粉是水产饲料的优质蛋白质源[13]。当豆粕替代不同比例鱼粉，使得饲料中豆粕添加量分别为35%和75%时，乌鳢的生长受到了显著影响，这可能与大豆中含有的某些营养拮抗因子，比如大豆凝集素、胰蛋白酶抑制因子、皂角甙等有关[14]。

利用高通量测序技术发现，脊椎动物消化道内存在大量的微生物。以人体为例，结肠内聚积着10倍于人体细胞数、100倍于人体基因组的细菌，种类达到1 150种之多[15]，这些细菌在肠道内构成了复杂的微生态系统[16]。消化道菌群与宿主和消化道环境（如饲料或食物及生境）三者之间构成了相互作用与相互依赖的"三角"关系，参与动物饲料消化、营养吸收、能量代谢的过程[17]。本试验通过对乌鳢肠道内的好氧菌进行培养，共筛选出21株具有产蛋白酶能力的好氧菌株。王建建等[18]通过对野生和养殖银鲳（*Pampus argenteus*）消化道内产酶菌进行分析，结果表明，野生银鲳消化道内分离到16株产酶菌，其中44%可培养菌能产蛋白酶，养殖银鲳消化道内分离到22株产酶菌，其中70%可培养菌可产蛋白酶。杨亚东等[19]用培养法对凡纳滨对虾（*Litopenaeus vannamei*）肠道内的微生物进行培养，共获得27株产蛋白酶的菌株。以上结果说明，动物肠道内的微生物具有分泌消化酶的功能，能协助宿主对营养物质进行消化吸收，从而提高宿主对饲料的利用率[20]。

Ray等[21]研究发现，生长在同一环境下摄食不同食物的卡特拉鲃（*Catla catla*）、印度鲮（*Cirrhinus mrigala*）和南亚野鲮（*Labeo rohita*）消化道菌群所产酶的种类和活性不同，这也证明了鱼类消化道菌群结构随食物的改变而发生"结构—功能"的变化。本研究中，用豆粕替代不同比例鱼粉后，乌鳢肠道产蛋白酶好氧菌株的种类和数量发生了变化。例如，D2和D3组乌鳢未检测出菌株P1002，D1组乌鳢未检测出菌株P1003、P1006、P1015和P1016，而D1和D2组乌鳢未检测出菌株P1020。同时，部分菌株的产蛋白酶能力也受到了显著的影响，豆粕替代鱼粉有助于提高菌株P1009和P1012的产蛋白酶能力。对其他鱼类的研究也证明，饲料蛋白质的来源显著影响肠道菌群结构。例如，用豆粕替代金头鲷（*Sparus aurata* L.）饲料中30%的鱼粉，其肠道中蓝藻和乳杆菌数量显著增加，但*Synergistetes*数量显著下降[22]。Gajardo等[23]用不同种类的植物性蛋白质源替代鱼粉饲喂大西洋鲑（*Salmo salar* L.），结果发现，全鱼粉对照组的大西洋鲑肠道内含有较多的杆菌属、链球菌属、梭菌属和鲸杆菌属，

以上结果可能与微生物生长所需营养成分有关，由于植物性蛋白质源中含有更多的难以消化的纤维和低分子低聚糖，因此也更利于以此为代谢底物的乳酸菌等微生物的生长[24-25]。

益生菌是一类具有巨大实用价值的生物工程产品，常见水产益生菌的种类主要有乳酸菌和芽孢杆菌等，其中应用最广泛的是能产生蛋白酶的芽孢杆菌，其在促进养殖动物生长、增强抗病力、改善水体环境等方面具有重要作用。另外，从养殖动物肠道内分离出的其他菌种也可以作为潜在益生菌进行开发利用。在本研究中，从乌鳢肠道内筛选的铜绿假单胞菌具有较高的产蛋白酶能力。Chythanya等[26]研究了铜绿假单胞菌胞外产物对哈维氏弧菌（*V. harveyi*）、副溶血弧菌（*V. parahaemolyticus*）、河弧菌（*V. fluvialis*）等对虾致病菌的抑菌效果，确定了铜绿假单胞菌对这些病原菌的抑菌作用。Vijayan等[27]发现铜绿假单胞菌能有效抑制弧菌和气单胞菌。鉴于铜绿假单胞菌在蛋白酶分泌和抑菌方面的重要功能，可以考虑将其作为益生菌开发的潜在菌种。同时，考虑到豆粕替代鱼粉后对乌鳢肠道内的产蛋白酶菌株及其产蛋白酶能力均产生了一定变化，因此在开发益生菌的同时，应考虑到饲料原料的影响，以期能最大程度地发挥益生菌的重要功能。需要注意的是，部分产蛋白酶菌株，如蜂窝哈夫尼亚菌和维氏气单胞菌，均属于条件致病菌[28-29]。

据估计，脊椎动物消化道内可被鉴定的微生物仅占10%，而能在实验室条件下进行培养的微生物仅占1%[30-31]。对淡水鱼如神仙鱼（*Pterophyllum scalare*）和眼斑星丽鱼（*Astronotus ocellatus*）以及海水鱼如漠斑牙鲆（*Paralichthys lethostigma*）进行的研究也发现，消化道厌氧菌在鱼类营养物质消化和吸收过程中发挥重要的作用，这些厌氧菌能够提供多种不同的酶，包括糖酶、磷酸酶、脂肪酶以及蛋白酶等，从而帮助鱼类对营养物质进行消化和吸收[32]。因此，本试验采用基础培养试验的方法对乌鳢肠道内产蛋白酶菌株进行分析，本身存在一定的局限性。另外，由于本试验仅采用淡水鱼类培养基进行产蛋白酶菌株的筛选，可能会导致某些可培养菌无法正常生长。因此，对乌鳢肠道益生菌的开发还需依赖菌株培养方法和试验手段的进一步提高。

4 结　论

① 乌鳢肠道内存在着丰富的产蛋白酶好氧菌，这些好氧菌的产蛋白酶能力存在一定的差异。其中，菌株 P1009、P1008、P1007、P1012 和 P1015 的产蛋白酶能力较强，R/r 值范围为 2.44～3.22。

② 豆粕替代鱼粉显著降低了菌株 P1004 和 P1018 的产蛋白酶能力，但显著增加了菌株 P1009 和 P1012 的产蛋白酶能力。随着豆粕替代鱼粉比例的增加，菌株 P1018 的产蛋白酶能力显著下降，该结果说明了消化道内菌群结构对食物具有可塑性。

③ 通过16S rDNA序列分析鉴定表明产蛋白酶能力最强的菌株P1009是铜绿假单胞菌，结合铜绿假单胞菌的特性，可以考虑将其作为益生菌开发的潜在菌种。

参考文献：

[1] GÓMEZ G D,BALCÁZAR J L.A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish[J].FEMS Immunology and Medical Microbiology,2008,52(2):145–154.

[2] LI M,WANG B H,ZHANG M H,et al.Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2008,105(6):2117–2122.

[3] POKUSAEVA K,FITZGERALD G F,VAN SINDEREN D.Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria[J].Genes and Nutrition,2011,6(3):285–306.

[4] GILL S R,POP M,DEBOY R T,et al.Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome[J].Sceience,2006,312(5778):1355–1359.

[5] BAIRAGI A,GHOSH K S,SEN S K,et al.Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts[J].Aquaculture International,2002,10(2):109–121.

[6] 何敏,汪开毓,张宇,等.复合微生物制剂对重口裂腹鱼生长、消化酶活性、肠道菌群及水质指标的影响[J].动物营养学报,2008,20(5):534–539.

[7] 赖凯昭,吕逸欢,梁明振,等.饵料中添加益生菌对奥尼罗非鱼生长性能和肠道蛋白酶活性的影响[J].南方农业学报,2012,43(11):1769–1774.

[8] FENG J B,HU C Q,LUO P,et al.Microbiota of yellow grouper (*Epinephelus awoora* Temminck & Schlegel, 1842) fed two different diets[J].Aquaculture Research,2010,41(12):1778–1790.

[9] CEREZUELA R,FUMANAL M,TAPIA-PANIAGUA S T,et al.Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae[J].Cell and Tissue Research,2012,350(3):477–489.

[10] TORRECILLAS S,MAKOL A,CABALLERO M J,et al.Effects on mortality and stress response in European sea bass,*Dicentrarchus labrax* (L.),fed mannan oligosaccharides (MOS) after *Vibrio anguillarum* exposure[J].Journal of Fish Diseases,2012,35(8):591–602.

[11] YAN Q Y,VAN DER GAST C,YU Y H.Bacterial community assembly and turnover within

the intestines of developing Zebrafish[J].PLoS One,2012,7(1):e30603.
[12] 钟蕾,向建国,曾丹,等.饵料对鳜肠道微生物多样性的影响[J].水生生物学报,2016,40(4):830–835.
[13] 周歧存,麦康森,刘永坚,等.动植物蛋白源替代鱼粉研究进展[J].水产学报,2005,29(3):404–410.
[14] FRANCIS G,MAKKAR H P S,BECKER K.Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish[J].Aquaculture,2001,199(3/4):197–227.
[15] QIN J J,LI R Q,RAES J,et al.A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J].Nature,2010,464(7285):59–65.
[16] O'HARA A M,SHANAHAN F.The gut flora as a forgotten organ[J].EMBO Reports,2006,7(7):688–693.
[17] HARRIS K,KASSIS A,MAJOR G,et al.Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders?[J].Journal of Obesity,2012,2012:879151.
[18] 王建建,高权新,张晨捷,等.野生与养殖银鲳消化道菌群结构中产酶菌的对比分析[J].水产学报,2014,38(11):1899–1909.
[19] 杨亚东,杨锡洪,解万翠,等.海水养殖凡纳滨对虾肠道产蛋白酶菌株的筛选、鉴定[J].现代食品科技,2015,31(1):131–136.
[20] LÉSEL R.Does a digestive active bacterial flora exist in fish?[C]//KAUSHIK S J,LUQUET P.Fish nutrition in practice.Biarritz:Ⅳth International Symposium on Fish Nutrition and Feeding,1993,61:655–664.
[21] RAY A K,ROY T,MONDAL S,et al.Identification of gut-associated amylase,cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps[J].Aquaculture Research,2010,41(10):1462–1469.
[22] PARMA L,CANDELA M,SOVERINI M,et al.Next-generation sequencing characterization of the gut bacterial community of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed low fishmeal based diets with increasing soybean meal levels[J].Animal Feed Science and Technology,2016,222:204–216.
[23] GAJARDO K,JARAMILLO-TORRES A,KORTNER T M,et al.Alternative protein sources in the diet modulate microbiota and functionality in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J].Applied and Environmental Microbiology,2017,83(5):e02615-16.

[24] DESAI A R,LINKS M G,COLLINS S A,et al.Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J].Aquaculture,2012,350/351/352/353:134–142.

[25] REVECO F E,ØVERLAND M,ROMARHEIM O H,et al.Intestinal bacterial community structure differs between healthy and inflamed intestines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J].Aquaculture,2014,420–421:262–269.

[26] CHYTHANYA R,KARUNASAGAR I,KARUNASAGAR I.Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* Ⅰ-2 strain[J].Aquaculture,2002,208(1/2):1–10.

[27] VIJAYAN K K,SINGH I S B,JAYAPRAKASH N S,et al.A brackishwater isolate of Pseudomonas PS-102,a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems[J].Aquaculture,2006,251(2/3/4):192–200.

[28] 马艳,李婷婷,崔方超,等.大菱鲆源蜂房哈夫尼亚菌群体感应现象及生物被膜调控的研究[J].现代食品科技,2016,32(8):70–76.

[29] 杨求华,郭松林,关瑞章,等.鳗鲡病原性维氏气单胞菌的分离与鉴定[J].生物技术通报,2012(7):134–139.

[30] ORPHAN V J,TAYLOR L T,HAFENBRADL D,et al.Culture-dependent and culture independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs[J].Applied and Environmental Microbiology,2000,66(2):700–711.

[31] BURKE J D,WEINTRAUB M N,HEWINS C R,et al.Relationship between soil enzyme activities,nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest[J].Soil Biology and Biochemistry,2011,43(4):795–803.

[32] RAMIREZ R F,DIXON B A.Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*),angelfish (*pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*)[J].Aquaculture,2003,227(1/2/3/4):417–426.

Effects of Replacement of Fish Meal by Soybean Meal on Composition and Protease-Producing Activity of Protease-Producing Aerobic Bacteria in Intestinal Tract of *Channa argus*

MIAO Shuyan* ZHU Jinyu ZHAO Chenze DONG Xiaojing SUN Longsheng

*Corresponding author, professor, E-mail: zhouqicun@nbu.edu.cn （责任编辑 菅景颖）

(*College of Animal Science and Techn*ology, *Yangzhou University*, *Yangzhou* 225009, *China*)

Abstract: In order to investigate the effects of replacement of fish meal by soybean meal on composition and protease-producing activity of protease-producing aerobic bacteria in intestinal tract of *Channa argus*, the protease producing bacteria in intestinal tract of *Channa argus* were isolated and cultured. The selected strains were further quantitatively assayed for the protease-producing activity. One control group (D_1 group) diet was formulated with fish meal as the main protein source, and the fish meal addition in this diet was 55%. Next then, two experimental group diets were formulated using soybean meal to replace different ratio of fish meal in control group diet, and the soybean meal in those two diets was 35% (D_2 group) and 75% (D_3 group), respectively. Each diet was assigned to three replicates of 28 *Channa argus* with the average body weight of （10.50±0.84） g for 8 weeks in a re-circulated water system indoor. The results showed as follows: The final weight, weight gain rate and specific growth rate was significantly decreased with the replacement ratio of fish meal by soybean meal increasing (P<0.05). A total of 21 protease-producing aerobic bacteria were isolated from the intestine of *Channa argus*, which was 16 from D_1 group, 19 from D_2 group and 20 from D_3 group. The replacement of fish meal by soybean meal significantly decreased the hydrolysis spot diameter（R）/strain diameter (r) value of strains P1004 and P1018 (P<0.05), which was used to express the protease-producing activity, but significantly increased the R/r value of strains P1009 and P1012 (P<0.05). With the replacement ratio of fish meal by soybean meal increasing, the R/r value of strain P1018 was significantly decreased (P<0.05). Physiological and biochemical characteristics identification and 16S rDNA sequence analysis revealed that the strain P1009, whose protease-producing activity was the highest in the present study, was *Pseudomonas aeruginosa*. In summary, the results indicate that there exist a great variety of protease-producing aerobic bacteria in intestinal tract of *Channa argus*, and the replacement of fish meal by soybean meal can affect both the quantity and protease-producing activity of protease-producing bacteria. Strain P1009 which from the intestinal tract of *Channa argus* has the highest protease-producing activity, and it can be as a potential source of probiotics.

Key words: *Channa argus*; protein source; protease-producing aerobic bacteria; protease-producing activity; probiotics